

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Антипова Сергея Сергеевича «**Структурно-функциональные характеристики белка Dps в условиях различного микроокружения и комплексования с ДНК**», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Актуальность исследования. Диссертационная работа Антипова Сергея Сергеевича посвящена изучению закономерностей распределения белка Dps по бактериальной ДНК, исследованию влияния компонентов микроокружения как на олигомерную форму белка, так и на его способность взаимодействовать с ДНК, с целью раскрытия механизмов взаимодействия Dps с ДНК и более детального понимания структурно-функциональных характеристик данного белка. Несомненно, что исследования структурной организации и функционирования генетического материала всех живых организмов являются важной фундаментальной задачей. Все живые организмы используют специальные структурные белки для сохранения своего генома в функционально активном состоянии. У высших организмов (эукариот) эту функцию выполняют структурные белки-гистоны. Геном бактерий (прокариот) отличается по своей структуре от генома эукариот: в нем отсутствует оформленное ядро, а генетический материал в комплексе с белками формирует нуклеоид, который представляет собой компартмент неправильной формы внутри бактериальной клетки. Прокариотические клетки не содержат классических гистонов, их функцию выполняют гистон-подобные белки, одним из которых является Dps – полифункциональный белок, играющий главную роль в поддержании конформации бактериальной ДНК на стационарной фазе роста. Принято считать, что основной олигомерной формой белка Dps является додекамер, который не содержит каких-либо модулей в своей структуре предназначенных для распознавания конкретных нуклеотидных последовательностей, а взаимодействие с отрицательно заряженным сахаро-фосфатным остовом ДНК осуществляется за счет формирования электростатических связей с положительно заряженными остатками аминокислот, локализованных в области N-концевого участка мономеров Dps. Однако имеются литературные данные, которые дают основание говорить о существовании в бактериальной хромосоме специфических мишеней для Dps. Несомненно, что данное научное противоречие требовало дополнительных исследований. Оставалось также неясным то, каким образом белок Dps обеспечивает упорядоченную компактизацию бактериальной хромосомы на стационарной фазе роста, когда количество этого белка достигает максимального значения и его доля составляет большую часть белков нуклеоида. Принимая во внимание всё вышесказанное, можно с уверенностью утверждать, что актуальность научных исследований в этом направлении несомненна.

Белок Dps выполняет и другие функции в бактериальной клетке. В частности, он способен окислять токсичные для клетки ионы двухвалентного железа с использованием пероксида водорода. После окисления железо проникает во внутреннюю полость белка, формируя его неорганическое ядро. Участие Dps в депонировании ионов железа является его уникальной особенностью, отличающей его от других белков нуклеоида. Именно поэтому Dps является чрезвычайно перспективным объектом исследований, цель которых состоит в выяснении возможности использования этого белка в качестве основы для создания ячеек памяти с супер высокой плотностью хранения информации, квантовых электронных приборов, биосенсоров высокой чувствительности, многослойных бионанобатарей. В связи с этим, не вызывает сомнения то, что изучение физико-химических свойств белка Dps, его функций, особенностей формирования нуклеопротеидных комплексов с его участием является актуальной научной задачей, важной как с фундаментальной, так и прикладной точек зрения.

Диссертационная работа написана по традиционному плану. Диссертация изложена на 452 страницах машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов с обсуждениями, заключения, выводов (эта часть диссертации изложена на 214 страницах). Другая часть диссертации содержит приложения и список литературы. Диссертация содержит 7 таблиц и 64 рисунка. Список литературы содержит 334 источника.

Обзор литературы написан компактно, без перегрузки деталями и хорошо проиллюстрирован. Раздел 1.1 посвящен описанию бактериального нуклеоида и характеристике его основных белков – «белков нуклеоида». В разделы с 1.2. по 1.7.2 посвящены описанию структуры и функциональных свойств белка Dps, специфичных особенностей его олигомеризации, его роли в клеточных процессах и обеспечении стрессовой устойчивости клеток *E. coli*, а также описанию моделей, объясняющих механизмы взаимодействия Dps с ДНК. Заключительная часть главы «Обзор литературы» посвящена описанию перспектив прикладного использования металлосодержающего белка Dps и его нуклеопротеидных комплексов. Резюмирует главу «Обзор литературы» подраздел «Обобщение литературных данных и постановка проблемы», являющийся, на мой взгляд, логичным завершением данной главы диссертации.

Глава 2 посвящена описанию методической части работы. В работе используется широкий набор методов молекулярной биологии, методов биоинформатического анализа, биофизических и биохимических методов исследования, в частности, таких как: получение рекомбинантного белка, получение первичных антител к белку Dps, секвенирование фрагментов библиотек ДНК, ПЦР, ДСН-гель-электрофорез, хроматографические методы очистки белка с проведением анализа соотношения олигомерных форм в очищенных препаратах белка, измерение изменений флуоресценции свободных молекул Dps и в составе нуклеопротеидного комплекса, XANES-

спектроскопия (X-ray Absorbance Near Edge Structure), футпринтинг ДНК – метод поиска в структуре ДНК нуклеотидных последовательностей для ДНК-связывающих белков, приготовление хроматина и его иммунопреципитация. С помощью метода EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) в работе проводилась оценка эффективности взаимодействия белка Dps с отдельными линейными фрагментами ДНК и их смесью. С использованием системы репортерной детекции на базе белка GFP проводился анализ экспрессии генов. Метод атомно-силовой микроскопии был использован для анализа морфологии отдельных молекул Dps, фрагментов ДНК и их нуклеопротеидных комплексов. С применением просвечивающей электронной микроскопии проводился анализ размеров неорганических частиц, входящих в состав олигомеров Dps. Методом динамического рассеяния света проводилась оценка гидродинамического радиуса частиц Dps и его комплексов. Исследование кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов Dps с линейными и искусственными разветвленными фрагментами проводилось посредством метода поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора ProteOn XPR (BioRad, США). Для выяснения способности фрагментов ДНК формировать изгибы двойной спирали использовалась компьютерная программа DNA Tools, визуализация проводилась с помощью программы RasMol. Методом последовательного молекулярного докинга проводилось моделирование процессов взаимодействия лигандов различной природы с олигомерами белка Dps.

Следует отметить, что методы, используемые в работе, подробно описаны, что важно, поскольку это позволит заинтересованным исследователям воспроизвести все необходимые экспериментальные условия.

Научная новизна исследования и практическая ценность работы. Глава 3 посвящена полученным результатам и их обсуждению. Первый этап работы заключался в исследовании физико-химических характеристик рекомбинантного белка Dps. Результаты работы, выполненные с привлечением таких методов, как: атомно-силовой микроскопии, флуоресцентной спектроскопии, XANES-спектроскопии, просвечивающей электронной микроскопии, Мёссбауэровской спектроскопии и других, позволили сделать обоснованные заключения, которые легли в основу выводов с 1 по 3. В частности, установлено, что неорганическое ядро белка Dps содержит атомы железа, как в трехвалентном, так и в двухвалентном состояниях. Показано, что присутствие ионов двухвалентного железа способствует процессу формирования додекамерной формы белка Dps. Особо интересным результатом этой части работы, на мой взгляд, является следующий: неорганические ядра во внутренней полости молекул Dps имеют разные размеры. Следующий этап экспериментальной работы заключался в исследовании взаимодействия белка Dps с ДНК, а также влияния ряда клеточных компонентов сахарной природы (D-галактуроната и D-глюкуроната) на процесс олигомеризации Dps и формирование нуклеопротеидных комплексов с его участием. Результаты этой части работы,

выполненные с привлечением таких методов, как: ПЦР, атомно-силовой микроскопии, метода задержки ДНК-белковых комплексов в геле, футпринтинга ДНК, метода последовательного молекулярного докинга позволили сделать обоснованные заключения, которые легли в основу выводов с 4 по 7. В частности, установлено, что D-глюкуронат и D-галактуронат являются функционально активными лигандами для Dps, способными влиять на эффективность его взаимодействия с ДНК. Обнаружено, что Dps способен связываться как с линейными, так и разветвленными участками ДНК. При этом большее сродство проявлялось у Dps к разветвленным структурам ДНК. С помощью электрофоретического фракционирования смеси, полученной при самосборке искусственных разветвлённых ДНК, было выявлено, что Dps более эффективно взаимодействует с их триплексами, а не дуплексами. Анализ морфологии поверхности таких нуклеопротеидов с помощью атомно-силовой микроскопии выявил, что Dps преимущественно локализован на внутренней части Y-подобных ДНК. Результаты исследований позволили также сделать интересное предположение о возможности взаимодействия Dps не только с ДНК, но и с РНК.

Раздел 3.14 главы III «Полученные результаты и их обсуждение» посвящен описанию исследований возможных конформационных изменений додекамеров Dps при формировании нуклеопротеидных комплексов, оценки их стабильности, а также констант связывания при взаимодействии с различными фрагментами ДНК. Для выполнения поставленных задач были применены следующие методы: методы динамического светорассеяния и флуоресцентной спектроскопии для исследований конформационных изменений молекул Dps отдельно и в составе нуклеопротеида в зависимости от температуры; метод поверхностного плазмонного резонанса для измерения констант связывания Dps с ДНК. Получены результаты, свидетельствующие о повышении устойчивости к тепловой денатурации белка Dps, когда он находится в комплексе с ДНК. С использованием программы Swiss-PdbViewer получены данные о распределении электростатического потенциала на поверхности додекамера Dps.

Завершающая часть исследования, результаты которого описаны в разделах с 3.15 по 3.19, посвящена изучению распределения белка Dps на геномной ДНК *E.coli* с использованием метода ChIP-Seq (Chromatin immunoprecipitation with direct sequencing). Полученные результаты нашли свое отражение в выводах 8–10. Был проведен полногеномный поиск сайтов связывания Dps, в результате которого выявлено их неслучайное распределение по бактериальной хромосоме. Обнаружено, что белок Dps способен взаимодействовать с областями генома, формирующими вторичные структуры, в том числе с REP-элементами (Repetitive Extragenic Palindromic sequences) и «*промоторными островами*», что подтверждает его сродство к разветвлённым структурам в ДНК. Выявлено, что сайты связывания Dps перекрываются с местами взаимодействия других структурных белков

нуклеоида, в частности, с белком Fis, заменяющего Dps на бактериальной хромосоме при переходе клеток к фазе активного роста. Эти данные указывают на то, что структурно-функциональная организация генома может контролироваться разными белками с использованием одних и тех же мест связывания. Результаты исследования позволили сделать обоснованное предположение, что белок Dps участвует в регуляции экспрессии генов, которая может быть опосредована интерференцией с РНК-полимеразой или белками, ингибирующими транскрипцию.

Значимость для науки и практики. Фундаментальная ценность диссертационной работы несомненна. Получены новые знания о структуре, функциональных особенностях и физико-химических свойствах основного архитектурного белка бактериального нуклеоида стационарно растущих клеток – белка Dps *E.coli*. Результаты исследования расширяют фундаментальные представления о механизмах формирования нуклеопротеидных комплексов, а также имеют важное прикладное значение. Спроектированные в работе элементарные, самособирающиеся Y-подобные конструкции наноразмерного диапазона (за счет управляемой иммобилизации молекул Dps в структуре нуклеопротеидного комплекса) могут быть использованы для решения прикладных задач в области материаловедения, полупроводниковой техники, медицины и биотехнологии.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Результаты диссертации следует использовать при разработке учебных курсов по молекулярной биологии, биофизики и биохимии в университетах Российской Федерации. Спроектированные и полученные в работе конструкции нанометрового диапазона в будущем могут быть использованы для решения прикладных задач в различных областях научно-промышленного комплекса России, в частности, в электронно-технической промышленности и медицине.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертантом получены оригинальные новые результаты, важные как для фундаментальной, так и прикладной науки. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. Выводы диссертации логично вытекают из представленного материала и подкреплены надёжными экспериментальными данными. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации. По материалам диссертации опубликована 31 работа, из которых 11 – в периодических отечественных и международных научных журналах из перечня ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, индексируемых базами данных Scopus и Web of Science; 4 статьи опубликованы в сборниках международных конференций; написаны 2 монографии. Оформлены две патентных заявки.

Личный вклад автора диссертации состоял в планировании и проведении экспериментов, в руководстве проведением экспериментов, в обработке, анализе и интерпретации полученных данных, в подготовке научных статей, а также апробации результатов исследования, которая осуществлялись лично автором, либо при его непосредственном участии.

К диссертационной работе имеется ряд замечаний и вопросов.

- **Вопрос:** как другие белки нуклеоида могут влиять на взаимодействие Dps с ДНК?
- **Вопрос:** почему исследования взаимодействия белка Dps с ДНК не проводились методом электронной микроскопии?
- **Вопрос:** Чем объясняется разброс размеров частиц белка от 1 нм до 12 нм на рисунке 21 (стр. 109)?
- **Уточняющий вопрос:** на стр. 77 в разделе, посвященном описанию определению нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК, указано, что использовали 1 М ДТТ? Действительно ли была использована такая большая концентрация ДТТ или это описка?
- **Замечание:** в разделе 3.1. (главы III. Полученные результаты и их обсуждение) исследовано влияние ЭМИ СВЧ на экспрессию гена *dps* в бактериальных клетках. Получены интересные результаты, которые, однако, не отражены в выводах.
- **Замечание:** результаты исследования, описанные в раздел 3.14 главы III, посвященные оценке термодинамических и конформационных свойств Dps в составе нуклеопротеидного комплекса, включающего фрагменты ДНК с различной структурной организацией, также не отражены в выводах.
- **Замечание:** в разделе 2.4 (главы II Материалы и методы исследования) не указано, при какой силе тока или при каком напряжении проводился ДСН-гель-электрофорез.
- **Техническое замечание,** относящееся к рисункам, представленным в диссертации: в рисунках, состоящих из нескольких частей, для обозначения этих частей используются буквы английского, а не русского алфавита (кроме рисунков 40 и 43).
- **Замечание технико-стилистического плана:** на стр. 55 после предложения «Для создания конечного изделия необходимо провести высокотемпературный отжиг, который выполняет две функции (Рис. 14-(II))», нет упоминания о том, какие это функции.
- **Имеется ряд орфографических ошибок:** на стр. 32 (которын), на стр. 37 (очевтдно), на стр. 107, «экспериментк», на стр. 174, в подписи к рисунку 51 (резонансеого), стр. 161 (гипотиза), на стр. 111 вместо «Dp» должно быть «Dps», на стр. 138 вместо «брёт», должно быть «берёт», на стр. 96 в разделе

2.27 в предложении «...в качестве эталона был использован устойчивости к воздействию канамицина» вероятно пропущено слово между словами «использован» и «устойчивости».

Представленные в отзыве замечания не являются принципиальными и не снижают высокой оценки представленной работы.

Заключение. Диссертационная работа Антипова Сергея Сергеевича «Структурно-функциональные характеристики белка Dps в условиях различного микроокружения и комплексования с ДНК» является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и имеющей большое научное и практическое значение. По актуальности изучаемой проблемы, научной новизне, практической значимости и обоснованности выводов представленная работа соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, (ред. от 28.08.2017), предъявляемым ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор – Антипов Сергей Сергеевич, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Главный научный сотрудник со степенью доктора наук
с возложением обязанностей заведующего лабораторией
Структуры и функций мышечных белков
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук, доктор биологических наук
(специальность «Биофизика»)

Иван Милентьевич Вихлянцев

10.05.2018 г.

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3
Тел. 8(4967) 739-334, факс 8(4967) 2874090.
E-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

«Подпись И.М. Вихлянцева» удостоверяю
Ученый секретарь ФГБУН ИГЭБ РАН
к.б.н.



И.Ю. Попова
10.05.2018 г.